

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-503664

(43) 公表日 平成9年(1997)4月15日

(51) Int.Cl.⁸

識別記号

庁内整理番号

F I

C 1 2 N 15/09

Z N A

9162-4B

C 1 2 N 15/00

Z N A A

C 1 1 D 3/386

9546-4H

C 1 1 D 3/386

C 1 2 N 9/08

9359-4B

C 1 2 N 9/08

// (C 1 2 N 9/08

C 1 2 R 1:685)

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 53 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-511202

(86) (22) 出願日 平成6年(1994)10月13日

(85) 翻訳文提出日 平成8年(1996)4月8日

(86) 国際出願番号 P C T / D K 9 4 / 0 0 3 8 2

(87) 国際公開番号 W O 9 5 / 1 0 6 0 2

(87) 国際公開日 平成7年(1995)4月20日

(31) 優先権主張番号 1 1 4 1 / 9 3

(32) 優先日 1993年10月13日

(33) 優先権主張国 デンマーク (D K)

(31) 優先権主張番号 9 9 5 / 9 4

(32) 優先日 1994年8月29日

(33) 優先権主張国 デンマーク (D K)

(71) 出願人 ノボ ノルディスク アクティーゼルスカ
ブ

デンマーク国, デーヨー-2880 パクスバ
エルト, ノボ アレ (番地なし)

(72) 発明者 ベデルセン, アンデルス イェルホルト
デンマーク国, デーヨー-2800 リングビ
ー, ニュプロ ブーンゲ 58

(72) 発明者 ビン, イェスベル
デンマーク国, デーヨー-2800 リングビ
ー, パクスバエルトバイ 115

(74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 H▲下2▼O▲下2▼安定ペルオキシダーゼ変異体

(57) 【要約】

本発明は秀れた過酸化水素安定性を示すコプリナス・シ
ネレウスの新規変異体に関する。

【特許請求の範囲】

1. アルカリ条件で改善された過酸化水素安定性を有するペルオキシダーゼ変異体であって、親ペルオキシダーゼ、配列番号1で示されるアミノ酸配列によってコードされるコプリナス・シネレウス (*Coprinus cinereus*) ペルオキシダーゼのアミノ酸残基48~56, 76, 109, 214, 239, 258~262, 264, 266~272の領域における1個又はそれ以上のアミノ酸残基の挿入、欠失又は置換によって特徴づけられている、前記ペルオキシダーゼ変異体。

2. 1又はそれ以上のアミノ酸残基が、次の如く：

K48S,

V53K, A,

H109K,

E214L,

E239A, V, L, I, P, F, W, M, G, S, T, C, Y, N, Q, D, K, R, H,

特にE239K, G, S, L, Q, M,

W258F, H,

M261A, V, L, I, P, F, W, G, S, T, C, Y, N, Q, D, E, K, R, H,

特にM261F, V, I, L, Q,

M268A, V, L, I, P, F, W, G, S, T, C, Y, N, Q, D, E, K, R, H,

特にM268F, V, I, L, Q,

Y272A, V, L, I, P, F, W, G, S, T, C, M, N, Q, D, E, K, R, H,

特にY272F

置換されている、請求の範囲第1項記載のペルオキシダーゼ変異体。

3. アルカリ条件下で改善された過酸化水素安定性を有するペルオキシダーゼ変異体であって、親ペルオキシダーゼ、配列番号1で

示されるアミノ酸によってコードされるコプリナス・シネレウスペルオキシダーゼのアミノ酸残基の1又はそれ以上のアミノ酸残基が、次の如く：

G72Q,

A91C,

N92K,
Q118E,
M125A, P, W, G, S, T, C, Y, N, D, E, K, R, H,
特にM125S, T,
S147Q,
I152C,
P155C,
M166A, P, W, G, S, T, C, Y, N, D, E, K, R, H,
特にM166S, T,
N192K,
I195K,
V206R,
K218R,
F229C,
A230C,
M242A, P, W, G, S, T, C, Y, N, D, E, K, R, H,
特にM242S, T,
S244C,
S252P,
M276A, P, W, G, S, T, C, Y, N, D, E, K, R, H,
特にM276S, T,
K278R,

M279A, P, W, G, S, T, C, Y, N, D, E, K, R, H,
特にM279S, T,
A304E,
V314P,
K41R+K48R,
V53K+Q118E,

V53A+E239G,
I152C+A91C,
P155C+A230C,
M166F+E239K,
G167N+V176L,
E214L+E239L,
R241E+E239K,
S244C+P155C,
E239K+M242I+Y272F,
M166F+E239K+M242I+Y272F,
M125L+M166F+E239K+M242I+Y272F

置換されている、前記ペルオキシダーゼ変異体。

4. 請求の範囲第1～3項のいずれか1項に記載のペルオキシダーゼ変異体の断片である、ペルオキシダーゼ変異体。

5. 請求の範囲第1～4項のいずれか1項に記載のペルオキシダーゼ変異体および過酸化水素又は過酸化水素前駆体、例えばパボラートもしくはパーカーボナート、又は過酸化水素発生酵素系、例えばオキシダーゼおよびその基質、又はペルオキシカルボン酸又はその塩を含んでなる漂白組成物。

6. ペルオキシダーゼ変異体の量が、1ml当たり0.01～20PODUの洗液中の濃度に相当し、そして過酸化水素又は過酸化水素前駆体又

は過酸化水素発生酵素系又はペルオキシカルボン酸又はその塩の量が、20mMまでの H_2O_2 の洗液中の過酸化水素濃度に相当する、請求の範囲第5項記載の漂白組成物。

7. 酸化性基質、例えば有機化合物、例えばフェノール性化合物又はフェノチアジン誘導体又はフェノキサジン誘導体を追加的に含んでなる、請求の範囲第5又は6項記載の漂白組成物。

8. 酸化性基質の量が、 $0.1\mu M$ ～ $100\mu M$ の洗液中の濃度に相当する、請求の範囲第7項記載の漂白組成物。

9. 界面活性剤、請求の範囲第1～4項のいずれか1項に記載のペルオキシダーゼ変異体および過酸化水素又は過酸化水素前駆体、例えばパボラートもしくはパーカーボナート、又は過酸化水素発酵系、例えばオキシダーゼおよびその基質、又はペルオキシカルボン酸又はその塩を含んでなる洗剤組成物。

10. ペルオキシダーゼ変異体の量が、1 ml当たり0.01～20PODUの洗液中の濃度に相当し、そして過酸化水素又は過酸化水素前駆体又は過酸化水素発酵系又はペルオキシカルボン酸又はその塩の量が、20mMまでの H_2O_2 の洗液中の過酸化水素濃度に相当する、請求の範囲第9項記載の洗剤組成物。

11. 酸化性基質、例えば有機化合物、例えばフェノール性化合物又はフェノチアジン誘導体又はフェノキサジン誘導体を追加的に含んでなる、請求の範囲第9又は10項記載の洗剤組成物。

12. 酸化性基質の量が、 $0.1 \mu M$ ～ $100 \mu M$ の洗液中の濃度に相当する、請求の範囲第11項記載の洗剤組成物。

【発明の詳細な説明】

H₂O₂安定ペルオキシダーゼ変異体

発明の分野

本発明は、ペルオキシダーゼの新規変異体、および該ペルオキシダーゼ変異体を含んでなる漂白組成物又は洗剤組成物に関する。

発明の背景

洗浄手順における漂白剤並びに洗剤組成物の成分としての使用は、当業界において公知である。従って、漂白剤は、商業的に入手可能な洗剤組成物の主成分の成分として配合されるか又は市販されている。洗剤組成物中に配合される重要な通常の漂白剤は、洗浄プロセス中形成される過酸化水素の前駆体として作用する化合物である。パーボラートおよびパーカーボナートは漂白剤として用いられそしてこの形式で漂白効果を示す化合物の重要な例である。これらの漂白剤により漂白の詳しい機構は、現在公知であるが、一般に次の内容が推定されている；すなわち洗浄中形成される過酸化水素は、着色物質（布帛上のしみの原因である）を、酸化により非着色物色に変えてそして着色物質の酸化は、パーボラート又はパーカーボナートとそれらの直接相互作用に起因して生じるかもしれない。

以下の内容が見出された；すなわち基質として過酸化水素を利用するペルオキシダーゼは、洗浄中過酸化水素の漂白効果を高めることができる。布帛上のしみを漂白するペルオキシダーゼの使用は、国際公開(W/O)89/09813に記載されている。また、以下の内容が見出された；すなわち染色布帛から浸出した着色物質は過酸化水素と共にペルオキシダーゼによって漂白できる。このように染色移行

を阻害するためのペルオキシダーゼの使用はW091/05839に記載されている。

発明の要約

驚くべきことに以下の内容が見出された；すなわち、アルカリ条件下過酸化水素に対し改善された安定性を有するペルオキシダーゼ変異体が、組換えDNA工学により作製できる。

従って、本発明は親ペルオキシダーゼ、配列番号1で示される配列によってコードされるコプリナス・シネレウス(*Coprinus cinereus*)ペルオキシダーゼのA

ミノ酸残基48～56, 76, 109, 214, 239, 258～262, 264, 266～272の領域における1個又はそれ以上のアミノ酸残基の挿入、欠失又は置換によって特徴づけられる、アルカリ条件で改善された過酸化水素安定性を有するペルオキシダーゼ変異体に関する。

親ペルオキシダーゼの結晶構造に関する情報は、X線回折および親ペルオキシダーゼのアミノ酸配列を他の公知ペルオキシダーゼアミノ酸配列に整列させることによって得られた(K.G. ウリンデル等、“Structure and evolution of peroxidases” in Plant Peroxidase Biochemistry and Physiology, K.G. ウリンデル等(編。)、コペンハーゲンおよびジェネバ大学 1993)。

本発明に関し、語句「改善された過酸化水素安定性」とは、ペルオキシダーゼ変異体が0.20mMまでの H_2O_2 濃度で過酸化水素の存在下、親ペルオキシダーゼよりも少なくとも10%より安定であることを示すものとする。より特異的には、このことは10℃～60℃の温度範囲内のある温度又は複数の温度でそして20mMまでの H_2O_2 の1又はそれ以上の H_2O_2 濃度でペルオキシダーゼ変異体は、野性型ペルオキシダーゼ(親ペルオキシダーゼ)よりも少なくとも10%より長い半減

期を有する。(半減期は、残留活性を最初の析の減衰に適合させることにより測定される)。語句「アルカリ条件」は、7～11のpH範囲を示すことが意図される。

他の面において、本発明は本発明に係るペルオキシダーゼおよび過酸化水素源を含んでなり、所望により追加して酸化性基質を含んでなる漂白組成物；および界面活性剤、本発明に係るペルオキシダーゼ変異体および過酸化水素源を含んでなり、所望により追加的に酸化性基質を含んでなる洗剤組成物に関する。

図面の簡単な説明

本発明を更に添付の図面により説明する。第1図はプラスミドpHD414を示し、これはプラスミドp775(ヨーロッパ特許238023に記載される)から誘導される。プラスミドpHD414は、例1に従って得られる。

発明の詳細な開示

本記載及び請求の範囲において、次の略記号が用いられる。

アミノ酸:

A=Ala=アラニン
V=Val=バリン
L=Leu=ロイシン
I=Ile=イソロイシン
P=Pro=プロリン
F=Phe=フェニルアラニン
W=Trp=トリプトファン
M=Met=メチオニン
G=Gly=グリシン

S=Ser=セリン
T=Thr=トレオニン
C=Cys=システイン
Y=Tyr=チロシン
N=Asn=アスパラギン
Q=Gln=グルタミン
D=Asp=アスパラギン酸
E=Glu=グルタミン酸
K=Lys=リシン
R=Arg=アラギニン
H=His=ヒスチジン

本発明に係るペルオキシダーゼ変異体において、次の命名法が引用を容易にするため用いられる。

もとのアミノ酸：位置：置換アミノ酸（1以上）

命名法によれば、例えば位置48でリシンをセリンにより置換することは、K48Sとして示され；同じ位置でのリシンの欠失はK48*として示され；そして追加のアミノ酸残基例えばチロシンの挿入は、K48KYとして示される。

多重置換は、プラスにより分離される、すなわち：E214L+E239Lは、位置214

および259においてロイシンをグルタミン酸で置換した突然変異を示す。

親ペルオキシダーゼは、配列番号1で示されるアミノ酸配列によってコードされる。該配列はコプリナス・シネレウス (*Coprinus cinereus*) から由来することができる。

本発明のペルオキシダーゼ変異体の一つの態様において、1又はそれ以上のアミノ酸残基が、配列番号1で示されるアミノ酸によりコードされる親ペルオキシダーゼのアミノ酸残基48～56, 76, 109,

214, 239, 258～262, 264, 266～272の領域内で欠失しているか、挿入されているか又は置換されている。

本発明に係るペルオキシダーゼ変異体の他の態様において、1又はそれ以上のアミノ酸残基は、次の如く好適合に置換され得る：

K48S,
V53K, A,
G72Q,
A91C,
N92K,
H109K,
Q118E,
M125A, P, W, G, S, T, C, Y, N, D, E, K, R, H,
特にM125S, T,
S147Q,
I152C,
P155C,
M166A, P, W, G, S, T, C, Y, N, D, E, K, R, H,
特にM166S, T,
N192K,
I195K,
V206R,

E214L,
K218R,
F229G,
A230C,
E239A, V, L, I, P, F, W, M, G, S, T, C, Y, N, Q, D, K, R, H,
特にE239K, G, S, L, Q, M,

M242A, P, W, G, S, T, C, Y, N, D, E, K, R, H,
特にM242S, T,

S244C,

S252P,

W258F, H,

M261A, V, L, I, P, F, W, G, S, T, C, Y, N, Q, D, E, K, R, H,

特にM261F, V, I, L, Q,

M268A, V, L, I, P, F, W, G, S, T, C, Y, N, Q, D, E, K, R, H,

特にM268F, V, I, L, Q,

Y272A, V, L, I, P, F, W, G, S, T, C, M, N, Q, D, E, K, R, H,

特にY272F,

M276A, P, W, G, S, T, C, Y, N, D, E, K, R, H,

特にM276S, T,

K278R,

M279A, P, W, G, S, T, C, Y, N, D, E, K, R, H,

特にM279S, T,

A304E,

V314P。

択一的態様において、本発明に係るペルオキシダーゼ変異体は、前記ペルオキシダーゼ変異体のフラグメントであってよい。

本発明によれば、ペルオキシダーゼの2以上のアミノ酸残基は次の如く置換されていてもよい：

K41R+K48R,
V53K+Q118E,
V53A+E239G,
I152C+A91C,
P155C+A230C,

M166F+E239K,
G167N+V176L,
E214L+E239L,
R241E+E239K,
S244C+P155C,
E239K+M242I+Y272F,
M166F+E239K+M242I+Y272F,
M125L+M166F+E239K+M242I+Y272F。

本発明によれば、本発明で開示した置換、挿入又は欠失は、国際公開W093/24 618に開示された置換、挿入又は欠失と組合わされることができ、ここにおいて 1 又はそれ以上のアミノ酸残基が、配列番号 1 で示される如き本発明で示される親ペルオキシダーゼのアミノ酸残基79～94, 125, 153～157, 161～204の領域内で欠失され、挿入され又は置換される。そのような組み合わせの例は、変異体M2 42I+Y272F+E239Kであり、これは例 4 で実証されるように極めて良好な過酸化水素安定性である。

親ペルオキシダーゼをコードするDNA配列を、当業界で周知の種々の方法により対象のペルオキシダーゼを生産する任意の微生物から単離できる。最初に、ゲノムDNAおよび/又はcDNAライブラリーが、研究されるべきペルオキシダーゼを生産する生物体から染色体DNA又はメッセンジャーRNAを用いて構築されるべきである。次いで、もしもペルオキシダーゼのアミノ酸配列が公知であるならば、相同の標識したオリゴヌクレオチドプローブが合成できそして細菌DNAのゲノムライブラリー由来の又は菌類cDNAライブラリー由来のペルオキシダーゼをコードするクローンを同定するために用いられる。択一的に、菌類のもう一つの菌株由来

のペルオキシダーゼに相同の識別化オリゴヌクレオチドプローブ含有配列が、低めのストレ

ンジェンシーのハイブリッド形成および洗浄条件を用い、ペルオキシダーゼをコードするクローンを同定するためプローブとして用いることができる。

ペルオキシダーゼ生産クローンを同定するためのもう一つの方法は、ゲノムDNAのフラグメントを発現ベクタ、例えばプラスミドに挿入し、生成ゲノムDNAライブラリーでペルオキシダーゼ陰性細菌を形質転換し、次いで形質転換された細菌を、ペルオキシダーゼに対する基質を含有する寒天上にプレートする。ペルオキシダーゼ担持プラスミドを含有するこれらの細菌は、過酸化水素の添加により、分泌されたペルオキシダーゼによる酸化のため、透明な寒天のハローにより囲まれたコロニーを生産する。

択一的に酵素をコードするDNA配列は、合成的に確立された標準法、例えばベアウカーグおよびM. H. カルザースにより記載されたホスホアミダイト法、Tetera *Letters* 22, 1981, 1859-1869頁、又はマテス等により記載された方法、1981, 1859-1869頁、*The EMBO J.* 3, 1984, 801-805頁により合成的に調製できる。ホスホアミダイト (phosphoramidite) 法によれば、オリゴヌクレオチドが例えば自動DNA合成機で合成され、精製され、アユールされ、結合されそして適当なベクター中でクローン化される。

最初に、DNA配列は、合成のゲノムの又はcxDNA起源 (適当な場合) のフラグメントを結合することによって作成される混合ゲノムおよび合成、混合合成およびcDNA又は混合ゲノムおよびcDNA起源から作成されるものであってよく、フラグメントは標準法に従い全DNA配列の種々の部分に相当する。DNA配列はまた、例えば米国特許4,683,202又はR. K. サイキ等、*Science* 239, 1988, 487-491頁に記載される如き特異的プライマーを用いてポリメラーゼ鎖反応 (PCR) により調製できる。

一度、ペルオキシダーゼをコードするDNA配列を単離されそして突然変異のための望ましい部位が同定されると、突然変異が合成ヌクレオチドを用いて導入さ

れ得る。これらのオリゴヌクレオチドは、所望の突然変異部位に隣接するヌクレオチドを含有し；突然変異ヌクレオチドはオリゴヌクレオチド合成中に挿入される。特異的方法において、ペルオキシダーゼをコードする配列を架橋する、DNAの一本鎖ギャップが、ペルオキシダーゼ遺伝子を有するベクター中で作られる。次いで、所望の突然変異を担持する合成ヌクレオチドを、一本鎖DNAの相同部分にアニールする。次いで残りのギャップはDNAポリメラーゼ I（クレノウフラグメント）でフィルインされ次いで構築体をT4リガーゼを用いて結合する。この方法の特異的例は、モリナガ等(1984, Biotechnology 2 : 646-639)に記載されている。1988年7月26日に発行されたエステルによる米国特許4,760,025は、カセットの小部分の変更を行うことによる、多重突然変異をコードするオリゴヌクレオチドの導入を開示しているが、しかし、より多様の突然変異がモリナガの方法によりいつでも導入できる、何故なら種々の長さの多数のオリゴヌクレオチドが導入できるからである。

ペルオキシダーゼをコードする配列に突然変異を導入するもう一つの方法は、ネルソンおよびロング、*Analytical Biochemistry* 180, 147-151頁に記載されている。その論文はPCR反応においてプライマーの一つとして、化学的に合成されたDNA鎖を用いることにより導入された所望の突然変異を含有するPCRフラグメントの3工程作成を含む。PCR-作成フラグメントから、突然変異を有するDNAフラグメントは制限エンドヌクレアーゼを用いて切断することにより単離できそして発現プラスミドに再挿入できる。

本発明によれば、前記の方法又は当業者に公知の択一的方法によ

って生産した突然変異したペルオキシダーゼをコードする配列は、発現ベクターを用い、酵素形で発現でき、該発現ベクターは典型的にはプロモーター、オペレーター、リボソーム結合部位、翻訳開始シグナル、および所望によりレプレッサー遺伝子又は種々の活性化遺伝子をコードする調節配列を含む。発現されたタンパク質の分泌を許容せしめるため、シグナル配列をコードするヌクレオチドは、ペルオキシダーゼをコードする配列の前に挿入できる。調節配列の方向下での発現に対し、標的遺伝子は、適当な読み枠内で調節配列に操作的に結合される。プ

ラスミドベクター内に挿入でき、そして変異体ペルオキシダーゼ遺伝子の翻訳を支持できるプロモーター配列は、原核 β -ラクタマーゼプロモーター(ピラーカマロフ等、1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 3727-3721)およびtacプロモーター(デボエル等、1983, Proc. U.S.A. 80: 21-25)に制限されない。更に、文献が「Useful Proteins from recombinant bacteria」 in Scientific American, 1980, 242: 74-94において見出される。一つの態様によれば、B. ズブチリス (subtilis) が、突然変化したDNAを有する発現ベクターにより形質転換される。もしも発現が分泌する微生物例えばB. ズブチリス (subtilis) 内が生起すべき場合、シグナル配列が翻訳開始シグナルにつづきそして対象のDNA配列に先行する。シグナル配列は翻訳生成物を細胞壁に輸送し該壁ではそれを分泌により生成物から分解される。先に定義した如き語句「調節配列」は、存在する場合シグナル配列を含むことが意図される。

本発明のペルオキシダーゼ変異体をコードするDNA配列で形質転換された宿主生物体は、酵母、好ましくはサッカロマイセス (Saccharomyces)、例えばサッカロマイセスセレビジエ (Saccharomyces cerevisiae) 又はシノサッカロマイセス ポムベ (Schizosaccharomy

ces pombe)、又はピチア (Pichia)、例えばピチアパストリス (Pichia pastoris) の菌株であってよい。

本発明のペルオキシダーゼ変異体を生産する今日の好ましい方法において、線維状菌類が宿主生物体として用いられる。線維状菌類宿主生物体は、好都合には、組換えタンパク質を生産するために宿主として既に用いたものであってよく、例えばアスペルギルス (Aspergillus) sp. 例えばA. ニガー (niger), A. ニダルアンス (nidulans) 又はA. オリゼ (oryzae) の菌株である。組換えタンパク質の生産におけるA. オリゼ (oryzae) の使用は、例えばヨーロッパ特許238023において広範囲に記載されている。

アスペルギルス (Aspergillus) におけるペルオキシダーゼ変異体の発現に対し、ペルオキシダーゼ変異体に対してコードするDNA配列がプロモーターにより先行される。プロモーターはアスペルギルス (Aspergillus) 中で強い転写活性を示

す如何なるDNA配列であつてよくそしてアミラーゼ、グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、ペルオキシダーゼ、セルラーゼ又は解糖酵素の如き細胞外又は細胞内タンパク質をコードする遺伝子から由来できる。

適当なプロモーターの例は、A. オリゼ (oryzae) TAKAアミラーゼ、リゾムコールマイヘイ (Rhizomucor miehei) アスパラ銀酸プロテアーゼ、A. ニガー (niger) 中性アミラーゼ、A. ニガー (niger) 酸安定性 α -アミラーゼ、A. ニガー (niger) グルコアミラーゼ、リゾムコールマイヘイ (Rhizomucor miehei) リパーゼ、A. オリゼ (oryzae) アルカリプロテアーゼ又はA. オリゼ (oryzae) トリオースホスファートイソメラーゼをコードする遺伝子から由来するプロモーターである。

特に、宿主生物体がA. オリゼ (oryzae) であるとき、本発明方法において使用するための好ましいプロモーターは、それがA. オ

リゼ (oryzae) 中で強い翻訳活性を示すように、A. オリゼ (oryzae) TAKAプロモーターである。TAKAアミラーゼプロモーターの配列は、ヨーロッパ特許238023に開示される。

停止およびポリアデニル化配列は、プロモーターと同じ起源から適当に由来できる。

菌類宿主細胞を形質転換するために用いられる技術は、ヨーロッパ特許238023に記載されるような適当なものでよい。

宿主細胞からペルオキシダーゼ変異体の分泌を確保するため、ペルオキシダーゼ変異体をコードするDNA配列は、シグナル配列によって先行されることができ、このシグナル配列は天然シグナル配列又はその官能部分又は細胞からタンパク質の分泌を与える合成配列であつてよい。特に、シグナル配列は、アスペルギルス (Aspergillus) sp. アミラーゼもしくはグルコアミラーゼをコードする遺伝子、リゾムコールマイヘイ (Rhizomucor miehei) リパーゼもしくはブナテアーゼをコードする遺伝子、又はフミコラ (Humicola) セルラーゼ、キシラナーゼ又はリパーゼをコードする遺伝子から由来できる。シグナル配列は、好ましくはA. オリゼ (oryzae) TAKAアミラーゼ、A. ニガー (niger) 中性アミラーゼ、A. ニガー (

niger)酸安定性 α -アミラーゼ、コプリナス・シネレウス (*Corprinus cinereus*) 又はマクロリザス(*macrorrhizus*)ペルオキシダーゼ、又はA. ニガー(*niger*)グルコアミラーゼをコードする遺伝子から由来する。

形質転換された細胞を培養するために用いられる培地は、アスペルギルス(*Aspergillus*)細胞を増殖するのに適した全ての普通培地である。形質転換体は通常安定でありそして選択圧力の不存在下で培養できる。しかし、もしも形質転換体が不安定であることが見出された場合、細胞へ導入される選択マーカーが選択に対して使用で

きる。

宿主細胞から分泌される成熟ペルオキシダーゼタンパク質は、遠心分離又は濾過による培地から細胞の分離、次いで塩例えば硫酸アンモニウムにより培地のタンパク質成分の沈殿、引き続きイオンクロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等のクロマトグラフィー手段を含む周知の手段により培地から好都合に回収できる。

ペルオキシダーゼ変異体の漂白効果を得るため、過酸化水素又は過酸化水素の前駆体、好ましくはパボラート又はポーカーボナート、又は過酸化水素発生酵素系、例えばオキシダーゼおよびその基質、又はペルオキシカルボン酸又はその塩がペルオキシダーゼ変異体に対し基質として本発明の漂白組成物中に存在すべきである。

着色物質のペルオキシダーゼ漂白の機構が布帛又は洗液中に存在するけれども、今日以下のように信じられている；すなわち酵素は過酸化水素を還元させそして着色物質（電子供与体基質）を酸化することによって作様し、これにより無色の物質を発生させるか又は布帛に吸着されない物質を与える。この反応は、下記の反応図式Iで示される。

反応図式 I :

供与体基質 + H_2O_2 ペルオキシダーゼ酸化された供与体 + H_2O

過酸化水素に感受性の少ない本発明に係るペルオキシダーゼ変異体を用いることにより、少量の酵素を漂白／洗液に加えそして満足な漂白効果を得ることが可

能である。

漂白組成物において、ペルオキシダーゼ変異の量は、0.1~20PDPU/mlの洗液中の濃度に相当し、そして過酸化水素又は過酸化水素前駆体又は過酸化水素酵素系又は過カルボン酸又はそれらの塩は20mMまでの H_2O_2 の過酸化水素濃度に相当する。

ペルオキシダーゼ活性の測定

1 ペルオキシダーゼ単位 (PODU) は、次の分析条件下毎分 1 μ mol の過酸化水素の変換する触媒する酵素の量である：0.88mM の過酸化水素、1.67mM の 2, 2'-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホナート)、0.1M ホスファート緩衝剤、pH7.0、30℃でインキュベートする、418nm で光度測定的に追跡される。

漂白組成物として本発明のペルオキシダーゼ変異体の使用に対し、以下の内容が見出された；すなわち、洗浄および／又はすすぎ工程の当初又はそれら中で、(本発明のペルオキシダーゼ変異体に対する) もう一つの酸化性基質の添加は、用いられるペルオキシダーゼ変異体の漂白効果を高めることができる。このことは、着色基質の漂白又は他の変形に関与するこの基質のラジカル又は他の酸化状態の形成に起因すると考えられている。そのような酸化性基質の例は、有機化合物例えばフェノール化合物、例えば p-ヒドロキシベンゼンスルホメートである。

本発明に対し使用できるフェノール化合物の他の例は、M. カートおよび S. シミズ、*Plant Cell physiol.* 26(7), 1985, 1291-1301 頁 (注特に表 1) 又は B. C. サンダース、*Peroxidase*, ロンドン、1964, 141 頁以降において与えられるものである。国際公開 W094/12621 において他のタイプの増強剤が開示されそしてこれらは本発明の目的に対し使用でき、例えばフェノチアジンおよびフェノキサジンおよびそれらの誘導体例えば 10-メチルフェノチアジン、10-フェノチアジン-プロピオン酸、N-ヒドロキシスクシンイミド-10-フェノチアジン-プロピオナート、10-エチル-4-フェノチアジンカルボン酸、10-エチルフェノチアジン、10-プロピルフェノチアジン、10-イソプロピルフェノチアジン、メチ

ル-10-フェノチアジンプロピオナート、10-フェノニルフェノチオチアジン、

10-アリルフェチアジン、10-(3-(4-メチル-1-ピペラジニル)プロピル)フェノチアジン、10-(2-ピロリジノエチル)フェノチアジン、プロアジン、2-クロロ-10-メチルフェノチアジン、2-アセチル-10-メチルフェノチアジンおよび10-Xチルフェノキサジンである。

酸化性基質の量は、 $0.1 \mu\text{M}$ ~ $100 \mu\text{M}$ の洗液中の濃度に相当する。

洗剤組成物

本発明によれば、ペルオキシダーゼ変異体は洗剤組成物の成分として添加できる。そのようなものとして、ペルオキシダーゼ変異体は洗剤用添加剤の形で洗剤組成物中に含ませることができる。洗剤組成物並びに洗剤添加剤は、1種以上の他の酵素、例えばプロテアーゼ、リパーゼ、アミラーゼ、クチナーゼあるいはセルラーゼを追加的に含んでなることができる。

特異的面において、本発明は洗剤用添加剤を提供する。酵素は1種又はそれ以上の酵素を含有する別個の添加剤を添加することにより、又は全てのこれらの酵素を含んでなる組合された添加剤を添加することにより洗剤組成物中に含ませることができる。本発明の洗剤用添加剤、すなわち別個の添加剤又は組合された添加剤は、例えば粒質物、液体、スラリー等として調合できる。好ましい洗剤用添加剤調合物は、粒質物、特に無粉塵性粒質物、液体、特に安定化液体、スラリー、又は保護された酵素である。

無粉塵性粒質物は、例えば米国特許4,106,991 および米国特許4,661,452 (双方ともノボルディスクA/Sに付与)に開示される如く製造できそして所望により当業者に公知の方法で被覆できる。洗剤用酵素は造粒前又は造粒後に混合され得る。ろうのようなコーティング材料の例は、平均分子量1000~2000を有するポリ(エチレ

ンオキシド)製品; 16~50個の酸化エチレン単位を有するエトキシ化ノニルフェノール; アルコールが12~20個の炭素原子を含有しそして15~80個の酸化エチレン単位が存在するエトキシ化脂肪アルコール; 脂肪アルコール; 脂肪酸; お

よび脂肪酸のモノーおよびジーおよびトリグリセリドである。流動床技術により適当に対し適当なフィルム形成コーティング材料の例は、英国特許1483591に示される。液体酵素調製品は、例えば確立された方法に従い、ポリオール例えばプロピレングリコール、糖又は糖アルコール、乳酸又はホウ酸を添加することにより安定化され得る。

保護された酵素は、ヨーロッパ特許238,216に記載された方法に従って製造できる。

本発明の洗剤組成物は、あらゆる通常の形態であってよく、例えば粉末、顆粒又は液体である。液体洗剤は典型的には70%までの水および0~30%の有機溶剤を有するか、又は非水性であってよい。

洗剤組成物は、1種又はそれ以上の界面活性剤を含むことができ、これらの各々はアニオン、非イオン、カチオン、双性又はこれらのタイプの混合物であってよい。洗剤は通常0~50%のアニオン界面活性剤、例えば直鎖アルキルベンゼンスルホナート(LAS)、 α -オレフィンスルホナート(AOS)、アルキルスルファート(脂肪アルコールスルファート)(AS)、アルコキシエトキシスルファート(AEOS又はAES)、第二級アルカンスルホナート(SAS)、 α -スルホ脂肪酸メチルエステル、アルキル又はアルケニルコハク酸又は石けんを含有するであろう。洗剤組成物はまた0~40%の非イオン界面活性剤例えばアルコールエトキシラート(AEO又はAE)、カルボキシル化アルコールエトキシラート、ノニルフェノールエトキシラート、アルキルポリグリコシド、アルキルジメチルアミノオキシド、エトキシル化脂肪酸モノエタノールアミド、脂肪酸モノエタノールア

ミド、又はポリヒドロキシアルキル脂肪酸アミド(例えばW092/06154に記載の如し)を含有していてもよい。

洗剤組成物は1種又はそれ以上の他の酵素、例えばアミラーゼ、リパーゼ、クチナーゼ、プロテアーゼおよびセルラーゼを追加的に含むことができる。

洗剤は、1~65%の洗剤用ビルダー又は錯化剤例えばビオライト、ジホスファート、トリホスファート、ホスホナート、シトラート、ニトロトリ酢酸(NTA)、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ジエチレントリアミンペンタ酢酸(DTMPA)、

アルキル―又はアルケニルコハク酸、可溶性シリケート又は層状シリケート（例えば、ヘキストからのSKS-6）を含有してもよい。洗剤はまたビルダーを含まなくてもよく、すなわち洗剤用ビルダーを本質的に含まなくてもよい。

洗剤は、1種以上のポリマーを含んでいてもよい。その例は、カルボキシメチルセルロース(CMC)、ポリ(ビニルピロリドン)(PVP)、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリ(ビニルアルコール)(PVA)、ポリカルボキシラート例えばポリアクリレート、マレイン酸/アクリル酸コポリマーおよびラウリルメタクリレート/アクリル酸コポリマーである。

洗剤は、漂白系を含有でき、この漂白系はパーボラート又はパーカーボナートの如き H_2O_2 源を含んでいてもよくそしてその H_2O_2 源は過酸―形成漂白活性化剤、例えばテトラアセチルエチレンジアミン(TAED)又はノナノイルオキシベンゼンスルホナート(NOBS)と組合せることもできる。択一的に、漂白系は、例えばアミド、イミド又はスルホンタイプのペルオキシ酸を含んでいてもよい。

本発明の洗剤組成物の酵素は、通常安定剤、例えばポリオール例えばプロピレングリコール又はグリセロール、糖又は糖アルコール

ル、乳酸、ホウ酸、又はホウ酸誘導体例えば芳香族ボラートエステルを用いて安定化でき、そして組成物は例えばW092/19709およびW092/19708に記載される如く調合できる。

洗剤は又他の通常洗剤成分、例えば粘土を含む布帛柔軟剤、起泡増進剤、起泡抑制剤、耐蝕剤、土壌―沈殿防止剤、抗土壌―再付着剤、染料、殺菌剤、蛍光増白剤又は香料を含有できる。(使用濃度で水性溶液中で測定される) pHは通常中性であるか又はアルカリ性であり、例えば7-11であろう。

本発明の範囲内の洗剤組成物の特定の形態には次下のものが含まれる：

1) 以下の成分を含んでなる少なくとも600 g/lの高密度を有する粒質物として配合される洗剤組成物：

―直鎖アルキルベンゼンスルホナート

(酸として計算)

7-12%

―アルコールエトキシスルファート

(例えばC ₁₂₋₁₈ アルコール、1-2 EO)又は	
-アルキルスルファート (例えばC ₁₆₋₁₈)	1-4%
-アルコールエトキシラート	
(例えばC ₁₄₋₁₅ アルコール、7 EO)	5-9%
-ナトリウムカーボナート (Na ₂ CO ₃ として)	14-20%
-可溶性シリケート (Na ₂ O, 2SiO ₂ として)	2-6%
-ゼオライト (NaAlSiO ₄ として)	15-22%
-ナトリウムスルファート (Na ₂ SO ₄ として)	0-6%
-ナトリウムシトラート/クエン酸	
(C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ /C ₆ H ₈ O ₇ として)	0-15%
-ナトリウムバボラート (NaBO ₃ ・H ₂ Oとして)	11-18%
-TAED	2-6%

-カルボキシメチルセルロース	0-2%
-ポリマー (例えばマレイン酸/アクリル酸 コポリマー、PVP, PEG)、	0-3%
-酵素	0-5%
-少量成分 (例えば気泡抑制剤、香料、 蛍光増白剤、光漂白)	0-5%
2) 以下の成分を含んでなる少なくとも600g/1の高密度を有する粒質物として配合される洗剤組成物:	
-直鎖アルキルベンゼンスルホナート	
(酸として計算)	6-11%
-アルコールエトキシスルホナート	
(例えばC ₁₂₋₁₈ アルコール、1-2 EO)又は	
-アルキルスルファート (例えばC ₁₆₋₁₈)	1-3%
-アルコールエトキシラート	
(例えばC ₁₄₋₁₅ アルコール、7 EO)	5-9%
-ナトリウムカーボナート (Na ₂ CO ₃ として)	15-21%

—可溶性シリケート (Na_2O , 2SiO_2 として)	1—4%
—ゼオライト (NaAlSiO_4 として)	24—34%
—硫酸ナトリウム (Na_2SO_4 として)	4—10%
—ナトリウムシトラート／クエン酸酸 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ ／ $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ として)	0—15%
—カルボキシメチルセルロース	0—2%
—ポリマー (例えばマレイン酸／アクリル酸 コポリマー、PVP, PEG)、	1—6%
—酵素	0—5%
—少量成分 (例えば気泡抑制剤、香料)	0—5%
3) 以下の成分を含んでなる少なくとも600g／lの高密度を有	

する粒質物として配合される洗剤組成物：

—直鎖アルキルベンゼンスルホナート (酸として計算)	5—9%
—アルコールエトキシラート (例えば C_{12-15} アルコール、7 EO)	7—14%
—脂肪酸の如き石けん (例えば C_{16-22})	1—3%
—炭酸ナトリウム (Na_2CO_3 として)	10—17%
—可溶性シリケート (Na_2O , 2SiO_2 として)	3—9%
—ゼオライト (NaAlSiO_4 として)	23—33%
—硫酸ナトリウム (Na_2SO_4 として)	0—4%
—過ホウ酸ナトリウム ($\text{NaBO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	8—16%
—TAED	2—8%
—ホスホナート (例えばEDTMPA)	0—1%
—カルボキシメチルセルロース	0—2%
—ポリマー (例えば、マレイン酸／ アクリル酸コポリマー、PVP, PEG)	0—3%

-酵素	0-5%
-少量成分 (例えば気泡抑制剤、香料、 蛍光増白剤)	0-5%
4) 以下の成分を含んでなる少なくとも600g/1の嵩密度を有する粒質物として配合される洗剤組成物:	
-直鎖アルキルベンゼンスルホナート (酸として計算)	8-12%
-アルコールエトキシラート (例えばC ₁₂₋₁₅ アルコール、7 EO)	10-25%
-ナトリウム カarbonat (Na ₂ CO ₃ として)	14-22%

-可溶性シリケート (Na ₂ O, 2SiO ₂ として)	1-5%
-ゼオライト (NaAlSiO ₄ として)	25-35%
-硫酸ナトリウム (Na ₂ SO ₄ として)	0-10%
-カルボキシメチルセルロース	0-2%
-ポリマー (例えばマレイン酸/アクリル酸 コポリマー、PVP, PEG)、	1-3%
-酵素	0-5%
-少量成分 (例えば気泡抑制剤、香料)	0-5%
5) 以下の成分を含んでなる水性液体洗剤組成物:	
-直鎖アルキルベンゼンスルホナート (酸として計算)	15-21%
-アルコールエトキシラート (例えばC ₁₂₋₁₅ アルコール、7 EO又は C ₁₂₋₁₅ アルコール、5 EO)	12-18%
-脂肪酸の如き石けん (例えばオレイン酸)	3-13%
-アルケニルコハク酸 (C ₁₂₋₁₄)	0-13%
-アミノエタノール	8-18%
-クエン酸	2-8%

－ホスホナート	0－3%
－ポリマー（例えばPVP, PEG）	0－3%
－ボラート（ B_4O_7 として）	0－2%
－エタノール	0－3%
－プロピレングリコール	8－14%
－酵素	0－5%
－少量成分（例えば分散剤、気泡抑制剤、 香料、蛍光増白剤）	0－5%
6) 以下の成分を含んでなる水性構成化液体組成物：	

－直鎖アルキルベンゼンスルホナート （酸として計算）	15－21%
－アルコールエトキシラート （例えば C_{12-15} アルコール、7 EO 又は C_{12-15} アルコール、5 EO）	3－9%
－脂肪酸の如き石けん（例えばオレイン酸）	3－10%
－ゼオライト（ $NaAlSiO_4$ として）	14－22%
－クエン酸カリウム	9－18%
－ボラート（ B_4O_7 として）	0－2%
－カルボキシメチルセルロース	0－2%
－ポリマー（例えばPEG, PVP）	0－3%
－定着ポリマー 例えばラウリルメタクリレート／アクリル酸ポリマー； モル比25：1；分子量3800	0－3%
－グリセロール	0－5%
－酵素	0－5%
－少量成分（例えば分散剤、気泡抑制剤、 香料、蛍光増白剤）	0－5%
7) 以下の成分を含んでなる少なくとも600 g / l の嵩密度を有する粒質物と	

して配合される洗剤組成物：

—脂肪アルコールスルファート	5—10%
—エトキシ化脂肪酸モノエタノールアミド	3—9%
—脂肪酸の如き石けん	0—3%
—炭酸ナトリウム (Na_2CO_3 として)	5—10%
—可溶性シリケート (Na_2O , 2SiO_2 として)	1—4%
—ゼオライト (NaAlSiO_4 として)	20—40%
—硫酸ナトリウム (Na_2SO_4 として)	2—8%

—過ホウ酸ナトリウム ($\text{NaBO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ として)	12—18%
—TAED	2—7%
—ポリマー (例えば、マレイン酸／ アクリル酸コポリマー、PEG)	1—5%
—酵素	0—5%
—少量成分 (例えば蛍光増白剤、 気泡抑制剤、香料)	0—5%

8) 以下の成分を含んでなる粒質物として配合される洗剤組成物：

—直鎖アルキルベンゼンスルホナート (酸として計算)	8—14%
—エトキシ化脂肪酸モノエタノールアミド	5—11%
—脂肪酸の如き石けん	0—3%
—炭酸ナトリウム (Na_2CO_3 として)	4—10%
—可溶性シリケート (Na_2O , 2SiO_2 として)	1—4%
—ゼオライト (NaAlSiO_4 として)	30—50%
—クエン酸ナトリウム (Na_2SO_4 として)	3—11%
—クエン酸ナトリウム ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ として)	5—12%
—ポリマー (例えばPVP, マレイン酸／アクリル酸コポリマー、PEG)	1—5%
—酵素	0—5%

—少量成分（例えば気泡抑制剤、香料）	0－5%
9) 以下の成分を含んでなる粒質物として配合される洗剤組成物：	
—直鎖アルキルベンゼンスルホナート	
（酸として計算）	6－12%
—非イオン界面活性剤	1－4%

—脂肪酸の如き石けん	2－6%
—炭酸ナトリウム (Na_2CO_3 として)	14－22%
—ゼオライト (NaAlSiO_4 として)	18－32%
—硫酸ナトリウム (Na_2SO_4 として)	5－20%
—クエン酸ナトリウム ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ として)	3－8%
—過ホウ酸ナトリウム ($\text{NaBO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ として)	4－9%
—漂白活性化剤（例えばNOBS又はTAED）	1－5%
—カルボキシメチルセルロース	0－2%
—ポリマー（例えばポリカルボキシラート又はPEG）	1－5%
—酵素	0－5%
—少量成分（例えば蛍光増白剤、香料）	0－5%
10) 以下の成分を含んでなる水性液体洗剤組成物：	
—直鎖アルキルベンゼンスルホナート	
（酸として計算）	15－23%
—アルコールエトキシスルファート	
（例えば C_{12-15} アルコール、2－3 EO）	8－15%
—アルコールエトキシラート	
（例えば C_{12-15} アルコール、7 EO又は C_{12-15} アルコール、5 EO）	3－9%
—脂肪酸の如き石けん（例えばラウリン酸）	0－3%
—アミノエタノール	1－5%
—クエン酸ナトリウム	5－10%
—ヒドロトロープ（例えばトルエンスルホン酸	

ナトリウム)	2-6%
-ボラート (B_4O_7 として)	0-2%
-カルボキシメチルセルロース	0-1%
-エタノール	1-3%

-プロピレングリコール	2-5%
-酵素	0-5%
-少量成分 (例えばポリマー、分散剤、香料、蛍光増白剤)	0-5%

11) 以下の成分を含んでなる水性液体洗剤組成物:

-直鎖アルキルベンゼンスルホナート (酸として計算)	20-32%
-------------------------------	--------

-アルコールエトキシラート (例えば C_{12-15} アルコール、7 EO又は C_{12-15} アルコール、5 EO)	6-12%
---	-------

-アミノエタノール	2-6%
-クエン酸	8-14%
-ボラート (B_4O_7 として)	1-3%

-ポリマー (例えばマレイン酸/アクリル酸 ポリマー、定着ポリマー、例えばラウリルメタクリレート/ アクリル酸コポリマーおよびCMC)	0-3%
---	------

-グリセロール	3-8%
-酵素	0-5%

-少量成分 (例えばヒドロトロープ、分散剤、香料、蛍光増白剤)	0-5%
---------------------------------	------

12) 以下の成分を含んでなる少なくとも600g/1の嵩密度を有する粒質物として配合される洗剤組成物:

-アニオン界面活性剤 (直鎖アルキルベンゼンスルホナート、 アルキルスルファート、 α -オレフィンスルホナート、	
---	--

α-スルホ脂肪酸メチルエステル、アルカンスルホナート、
石けん) 25-40%
-非イオン界面活性剤

(例えばアルコールエトキシラート)	1-10%
-炭酸ナトリウム (Na_2CO_3 として)	8-25%
-可溶性シリケート (Na_2O , 2SiO_2 として)	5-15%
-硫酸ナトリウム (Na_2SO_4 として)	0-5%
-ゼオライト (NaAlSiO_4 として)	15-28%
-過ホウ酸ナトリウム ($\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ として)	0-20%
-漂白活性化剤 (TAED又はNOBS)	0-5%
-酵素	0-5%
-少量成分 (例えば香料、蛍光増白剤)	0-3%

13) 1) -12) において記載した如き洗剤調合物であって、ここで直鎖アルキルベンゼンスルホナート又はその一部の含量が、アルキルスルファート (C_{12} - C_{18}) により置換されている。

14) 1) -13) において記載した如き洗剤調合物であって、この調合物は追加の成分として又は既に言及した漂白系に対する置換体として安定化又はカプセル化過酸を含有する。

15) マンガン触媒を追加的に含有する 1), 3), 7), 9) および 12) に記載の如き洗剤組成物。マンガン (Manganese) 触媒は、例えば "Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching", *Nature* 369, 1994, 637-639 頁に記載された化合物の一つであってよい。

17) 液体非イオン界面活性剤、例えば直鎖アルコキシ化第一級アルコール、ビルダー系 (例えばホスファート) 酵素およびアルカリを含んでなる非水性洗剤液体として調合される洗剤組成物。この洗剤もまた非イオン界面活性剤および/又は漂白系を含むこともできる。

現在、次のように考えられている：すなわち本発明の洗剤組成物において、ペルオキシダーゼ変異体は 0.01~20 PODU/ml の洗液中で

の濃度に相当する量で添加され得る。

本発明を、以下の実施例により更に説明するが、いかなる場合も権利要求される本発明の範囲に限定されない。

例 1

コプリナス・シネレウス (*Coprinus cinereus*) ペルオキシダーゼのK485変異体を発現するプラスミドの構築

1. コプリナス・シネレウスペルオキシダーゼをコードするcDNAのクローニング

PCRによるプロブの構築

ペルオキシダーゼcDNA断片を、コプリナス・マクロリザス (*Coprinus macrorhizus*) ペルオキシダーゼのアミノ酸配列を基礎にして構築された特異的オリゴヌクレオチドプライマー (R. K. サイキ等、*Science* 239, 1988, 487-491頁) を用い、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて調製した。PCRは製造者の指示に従い遺伝子Ampキットおよび装置 (パーキンエレメーシータス、ノルウォーク、CT、米国より入手可能) を用いて行ったが、但し反応を第一の鎖のcDNA (コプリナス・シネレウス (*Coprinus cinereus*), IF08371から得られるmRNAから調製) に対してより良いハイブリット形成を得るため28℃で最初の3回のサイクルを行い次いで65℃で30回のサイクルのPCRを行った。

次の特異的プライマーをPCRに対して用いた：

1. 5' - GCGCGAATTCGTNGGNATNAACCACGG - 3' T T
2. 3' - TACAGNTTGACGGGNGGCCTAGGCG - 5' A A
3. 5' - GCGAATTCACNCCNCAGGTNTTCGACAC - 3' A T T
4. 3' - GGNAAGGGNCCNCTCAAGCCTAGGCG - 5' A T A

A

5. 5'-GCGCGAATTCTGGCAGTCNAC-3'

A

6. 5'-GCGCGAATTCTGGCAGAGNATG-3'

T

7. 3'-CGNTACCGNTTCTACAGCCTAGG-5'

“N”は全ての4個のヌクレオチドの混合物を示す。プライマーを次の如く組み合わせる：1と2，3と4，5と7，6と7，1と4，1と7および3と7。5'-末端でEcoRIサイトそして3'-末端でBamHIを有する、PCR断片をこのようにして延長した。PCR反応を1%アガロースゲルで分析した。予期した寸法のバンドを全ての反応において見出した。バンドがペルオキシダーゼ特異性配列に対応することを立証するため、ゲルをサザン法に委ねそして次下の配列を有するオリゴヌクレオチドプローブにハイブリッド形成させた：

T A A A T
5'-GTCTCGATGTAGAACTG-3'
T

この配列はPCRプライマー3および4間に位置している。プローブは約130bp, 420bp, 540bpおよび240bpのバンドにハイブリッド形成することが見出された、従って観察されたDNAバンドは、ペルオキシダーゼ配列に相当する。

種々のPCR反応からのDNAを、EcoRIおよびBamHIで消化し次いでプラスミドpUC19中にクロニングした（C. ヤニシベルロン等、gene 33, 1985, 103-119頁）。正しいPCR断片を含有するコロニーを、前記オリゴヌクレオチドプローブを用いハイブリッド形成により同定した。陽性コロニーからのDNAを制限酵素地図およびサンガー等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 5463-5467頁により記載

された如く部分DNA配列分析により分析した。プライマー1および4を用いることにより得られた、クローンの一つからの430bp断片を用い以下に記載する如くコプリナス・シネレウス (*Coprinus cinereus*) cDNAをスクリーンした。

E. コリー中のコプリナス・シネレウスcDNAライブラリーの構築

ペール等(EMBO J., 3 : 1097-1102, 1984)およびチルクウイン等 (Biochemistry (Wash), 18 : 5294-5299, 1979) によって記載された方法によりペルオキシダー

ゼの最大活性に対する時間において集められた。均質化コプリナス・シネレウス (*Coprinus cinereus*) (IFO8371) から全RNAを抽出した。ポリ (A) -含有RNAを、アビブおよびリーダー (PNAS, USA 69: 1408-14-12, 1972) により記載される如くオリゴ (dT) -セルロース上のアフィニティクロマトグラフィーの2回サイクルにより得る。cDNAを、製造者の指示に従いインビトロゲン (Invitrogen) からのcDNA合成キットにより合成する。コプリナス・シネレウスcDNAライブラリーからの約50,000 E. コリー組換え体を、ワットマン540ペーパーフィルターに移した。コロニーを、ブリー等 (Nucleic Acids Res. 7, 2115-2135, 1979) により記載される如く溶解しそして固定化した。フィルターを、0.2×SSC, 0.1%SDS中で³²P-ラベル化430bpペルオキシダーゼ特異性プローブとハイブリッド形成した。フィルターのハイブリッド形成および洗浄を65℃で行い次いで強化スクリーンを用い24時間オートラジオグラフィーにより追跡した。オートラジオグラフィー後、フィルターを上昇温度で洗浄し、引き続き増強スクリーンで24時間オートラジオグラフィーにより追跡した。このようにして、50個以上の正のコロニーを同定した。ミニプレッププラスミドDNAを、標準法 (バームボイムおよびドリー Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523, 1979) によりハイブリッド形成コロニーから単離し、次いでcDNA

インサートのDNA配列を、サンガージデオキシ手順 (サンガー等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1977, 5467) により測定した。ペルオキシダーゼcDNA断片を、Hind III/XhoIを用い分解によりベクターから切除し次いでアガロースゲル電気泳動により精製し、電気溶出し次いで連結反応に対し準備した。cDNA断片をHind III/XhoI消化pHD414に結合させpCipを発生させそしてここにおいてcDNAはアスペルギルスオリゼ (*Aspergillus oryzae*) からのTAKAプロモーターおよびアスペルギルスニガー (*Aspergillus niger*) からのAMGターミネーターの翻訳制御下にある。

アスペルギルス発現ベクターpHD414の構築

ベクターpHD414は、(ヨーロッパ特許238023に記載された) プラスミドp775の誘導体である。p775に対照して、pHD414はプロモーターとターミネーター間の独特の制限部位の鎖を有する。

プラスミドを、ターミネーターの3'末端に（好ましくない制限部位を含有する）約200bp長の断片の除去および引き続き、また好ましくない制限部位を含有する、プロモーターの5'末端に約250bp長の断片の除去により構築した。200bp領域を、（pUCベクター中に位置している）NarIおよび（ターミネーターに対し丁度3'に位置している）XhaIを用いて切断によりp775から除去し、引き続きクレーノDNAポリメラーゼおよびdNTPで生成末端を平滑末端にし、ゲル上のベクター断片を精製し次いでベクター断片を再結合した。DNAを前記の如くE. コリーMC1061中に形質転換した。10個のコロニー（pHD413-1~10）を選択し次いで制限酵素分析により分析した。制限酵素分析において予期したバンドパターンを示すクローンの一つをpHD414の構築において用いた。

pHD413を、（プロモーターの5'末端内に置かれた）StuIおよび（pUCベクター内に置かれた）PvuIIで切断した。ベクター断片を精

製し、再結合しそしてE. コリーMC1061内に形質転換した。12個のコロニーを選択しそして制限酵素分析により分析した。全ての12個のクローンは、予期したバンドパターンを示した。プラスミドpHD414を第1図に示す。

2. 3-工程PCR 変異誘発

3-工程の突然変異化は、4個のプライマーの使用を含む：

変異誘発性プライマー (=A) : 5'-CCT GTT CGA TCG ATT CTT AGA-3'

PCR ヘルパー 1 (=B) : 5'-TGA TCA TAG TAC CAT CTA ATT ACA TCA AGC
GGC-3'

PCR ヘルパー 2 (=C) : 5'-CTG TAA TAC GAC TCA CTA-3'

PCR ハンドル (=D) : 5'-TGA TCA GAC TAG TAC CAT-3'

プライマーAおよびBを、20pmole/ μ lに希釈した。プライマーCおよびDを、100pmole/ μ lに希釈した。

全ての3工程を以下の成分を含有する10×PCR緩衝液中で行った：1000mM トリス-HCl, pH8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.1%ゼラチン、各々2mM dATPの200 μ l、2mM dCTPの200 μ l、2mM dGTPの200 μ l、2mM TTPの200 μ lおよび200 μ lのH₂O。

工程1において、 $10\mu\text{l}$ の $10\times\text{PCR}$ 緩衝液、 $50\mu\text{l}$ の $2\times\text{ヌクレオチド}$ 溶液、 $5\mu\text{l}$ のプライマーA、 $5\mu\text{l}$ のプライマーB、 $1\mu\text{l}$ のpCiP ($0.05\mu\text{g}/\mu\text{l}$)、 $30\mu\text{l}$ の H_2O 、 $0.5\mu\text{l}$ のTaqポリメラーゼおよび $80\mu\text{l}$ のパラフィンから構成される反応混合物を、 94°C で2分からなる1サイクル、 94°C で1分、 50°C で1分および 72°C で2分から成る15回のサイクル、 94°C で1分、 50°C で1分および 72°C で3分から成る15回のサイクルおよび 72°C で5分から成る1回のサイクルによって操作した。

$10\mu\text{l}$ のPCR生成物をアガロースゲル上で精製し次いで $10\mu\text{l}$ の H_2O に溶解した。次いで、工程2を行った。 $10\mu\text{l}$ の $10\times\text{PCR}$ 緩衝

液、 $50\mu\text{l}$ の $2\times\text{ヌクレオチド}$ 溶液、工程1の精製生成物 $5\mu\text{l}$ 、 $1\mu\text{l}$ のpCiP ($0.05\mu\text{g}/\mu\text{l}$)、 $30\mu\text{l}$ の H_2O 、 $0.5\mu\text{l}$ のTaqポリメラーゼおよび $80\mu\text{l}$ のパラフィンから構成される反応混合物を、 94°C で5分、 50°C で2分そして 72°C で10分から成る1回のサイクルで操作した。

工程2の反応混合物に対し、 $1\mu\text{l}$ のプライマーCおよび $1\mu\text{l}$ のプライマーDを添加した。PCR反応を工程1で記載した如く行なった。

3. 変異誘発された制限断片の単離工程3からの生成物をアガロースゲルから単離し次いで $20\mu\text{l}$ の H_2O に再溶解した。次いで、全容量 $20\mu\text{l}$ 中でウシ血清アルブミン(BSA)を加えたNEBuffer、2 (ニューイングランド、バイオラボ) に溶解した制限酵素XbaIおよびKpnIを用い 37°C で一夜それを消化した。570bpのXbaI/KpnI断片をアガロースゲルから単離した。

4. 発現ベクターpCiPへの結合

発現プラスミドpCiPを、前記の条件下XbaIおよびKpnIで切断し、次いで大きな断片をアガロースゲルから単離した。このベクターに、前記の単離した変異誘発した断片を結合させ次いで結合混合物を用いE. コリーを形質転換した。断片の存在および配向を、制限酵素を用い形質転換体からのプラスミド調製物の切断により立証した。配列の分析は、サンガーにより開発されたジデオキシ停止法を用い二本鎖プラスミドについて行った。生成プラスミドは、改変コドンを除きpCiPと同一である。

例2

コプリナスペルオキシダーゼの他の変異体を発現するプラスミドの構築

次の突然変異体を例1で記載した方法と同じ方法を用いて構築し

た。但し他の制限酵素をPCR-生成物の消化のため用いそしてベクターを変異誘発した断片の再クローニングのため用いた。修飾のために用いた変異体およびプライマーを以下に掲げる。

変異体

プライマー A 配列

K48S	5'-CCT GTT CGA TCG ATT CTT AGA-3'
V53K	5'-CTT AGA ATT AAA TTC CAT GAC-3'
G72Q	5'-GAT GGA GCC ATC GGC GCC TCC TTG ACC GAA TTG ACC-3'
A91C	5'-GCC TTC CCG TGC AAT GGC GGC-3'
N92K	5'-TTC CCG GCT AAA GGA GGC CTC-3'
H109K	5'-GGT ATT AAT AAA GGT GTC TCT-3'
Q118E	5'-GAT CTC ATC GAA TTC GCC ACT-3'
M125G	5'-GCC GTC GGC GGG TCC AAC TGC-3'
M125A	5'-GCC GTC GGC GCC TCC AAC TGC-3'
S147Q	5'-ACC GGG GAT CAA GCT TGG AGG TTG GGG TTG GGA ACT-3'
I152C	5'-CCT TCG TTG TGT CCC GGG CCC-3'
P155C	5'-G ATC CCC GGG TGC GGA AAC ACT-3'
M166G	5'-TTG GAT CGT GGG GGC GAT GCA-3'
N192K	5'-GAG GGT TTA AAA TCG GCC ATC-3'
I195K	5'-G AAC TCG GCC AAA TTC AGG TCT-3'
V206R	5'-CTG GGT ATC GAA GCG CTG AGG GGT CGA-3'
K218R	5'-CTG AGT GGT GCC TCG GAG CAA GGT CTC-3'
E214L	5'-TCT ACA TTT TAA CCT TGC TC-3'
F229G	5'-GAG CTC CTC GGC GCC GCC GAG AGA AGG-3'
A230C	5'-CTC GGC TTT TGC GAG GAA CTC-3'
E239G	5'-TTC CCT GGC GGC TTC CGC ATG-3'
E239H	5'-TTC CCT GGC CAC TTC CGC ATG-3'
E239K	5'-TTC CCT GGC AAA TTC CGC ATG-3'
E239L	5'-TTC CCT GGC CTA TTC CGC ATG-3'
E239M	5'-TTC CCT GGC ATG TTC CGC ATG-3'
E239Q	5'-TTC CCT GGC CAA TTC CGC ATG-3'
E239S	5'-TTC CCT GGC TCA TTC CGC ATG-3'
E239T	5'-TTC CCT GGC ACA TTC CGC ATG-3'
E239W	5'-TTC CCT GGC TGG TTC CGC ATG-3'
E239R	5'-TTC CCT GGC CGA TTC CGC ATG-3'

M242G	5'-GAA TCC CGC GGG AGG TCC GAT-3'
S244C	5'-T CGC ATG AGG TGC GAT GCT CTC-3'
S252P	5'-CG GCA GGC GGT CCG CGG GTC GCG AGC-3'
W258F	5'-GCA TGC CGA TTT CAA TCC AT-3'
W258H	5'-GCA TGC CGA CAT CAA TCC AT-3'
M261F	5'-TGG CAA TCC TTT ACT AGT AGC-3'
M261G	5'-TGG CAA TCC GGG ACC AGC AGC-3'
M261Y	5'-TGG CAA TCC TAT ACC AGC AGC-3'
M261V	5'-TGG CAA TCC GTC ACC AGC AGC-3'
M268L	5'-AAT GAA GTC CTA GGC CAG CGA-3'
M268G	5'-AAT GAA GTT GGG GGC CAG CGA-3'
M268A	5'-AAT GAA GTT GCA GGC CAG CGA-3'
M268F	5'-AAT GAA GTT TTT GGC CAG CGA-3'
Y272F	5'-GGG CCA GCG CTT TCG CGC CGC C-3'
Y272G	5'-GGC CAG CGA GGG CGC GCC GCC-3'
Y272A	5'-GGC CAG CGA GCC CGC GCC GCC-3'
M276S	5'-CGC GCC GCC TTT GCC AAG ATG-3'
M276I	5'-CGC GCC GCC ATA GCC AAG ATG-3'
M276H	5'-CGC GCC GCC CAC GCC AAG ATG-3'
K278R	5'-AG AAC AGA CAT GCG CGC CAT GGC GGC-3'
M279G	5'-ATG GCC AAG GGG TCT GTT CTC-3'
M279A	5'-ATG GCC AAG GCC TCT GTT CTC-3'
A304E	5'-AT AAC AGG CGC CTC GTT GGA CAC-3'
V314P	5'-GGC CTT ACT CCC GAT GAT ATC-3'
K41R + K48R	5'-AAT TCT AAG AAT TCG GCG AAC AGG GCT CTC
ACA TCG GGA CCC TTG-3'	
G167N + V176L	5'-AAG CAA GTC AAC GAG CTC ATC AGG GCT GAA
GCC TGC ATC GTT CAT ACG ATC CAA-3'	
R241E + E239K	5'-TTC CCT GGC AAG TTC GAA ATG AGG TCC-3'.

以下の内容は注目すべきである；すなわち、位置1-29の中にある変異体を、BSAが加えられたNEBuffer 3（ニューイングランド、バイオラボ）中BamHIおよびXbaIで消化し、160bpの断片を生成した。位置30-219における変異体を、BSAが加えられたNEBuffer 2中XbaI/KpnIで消化し、570bpの断片を生成した。位置20-277に

における変異体を、BSAが加えられたNEBuffer 2中KpnI/MscIで消化し、170bpの断片を生成した。位置278-363における変異体を、BSAが加えられたNEBuffer 2中MscI/XhoIで消化し、420bpの断片を生成した。

例3

アスペルギルス・オリゼ (Aspergillus oryzae) 中でのコプリナスペルオキシダーゼ変異体の発現

アスペルギルス・オリゼ又はアスペルギルス・ニガーの形質転換 (一般的手段)

100 mlのYPD培地 (シャーマン等、Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981) に、A. オリゼ又はA. ニガーの胞子を接種し次いで37℃で振とうしながら一夜インキュベートした。菌糸をミラクロス (miracloth) を通して濾過により集め次いで0.6Mの MgSO_4 200mlで洗浄した。菌糸を15mlの1.2M MgSO_4 、10mM NaH_2PO_4 pH=5.8中に懸濁させた。懸濁液を氷上で冷却し、次いで120mgのノザザイム (Novozym) (商標) 234、バッチ1687を含有する1mlの緩衝液を加え、次いで穏やかな攪拌を伴うインキュベーションを、多数のプロトプラストが顕微鏡下で検査したサンプルにおいて可視できるまで、37℃で1.5-2.5時間継続した。

懸濁液をミラクロスを通して濾過し、濾液を滅菌管に移しそして5mlの0.6M ソルビトール、100mM トリス-HCl、pH=7.0で加層した。遠心分離を100×gで15分間行ない、次いでプロトプラストを MgSO_4 クッションの頂部から採取した。2容量のSTC (1.2M ソルビトール、10mM トリス-HCl、pH=7.5、10mM CaCl_2) をプロトプラスト懸濁液に加え次いで混合物を1000×gで5分間遠心分離した。プロトプラストペレットを3mlのSTC中に再懸濁させ次いで再度小球にした。この手順をくりかえした。最後に、プロトプラストを

0.2-1mlのSTC中に再懸濁させた。

100 μ l のプロトプラスト懸濁液を、10 μ l のSTC中で5-25 μ g の適当なDNAと混合した。A. オリゼのA1560菌株 (IFO4177) からのプロトプラストをpToC186 (A. ニドランシams遺伝子含有プラスミド) と混合した。混合物を室温で25分間放置した。60%PEG4000 (BDH29576)、10mM CaCl_2 および10mM トリス-HClの0.2ml (pH=7.5) を注意深く混合し (2回) 次いで最後に同溶液0.85mlを加えそして注意深く混合した。混合物を室温で25分間放置し、2500×gで15分間回転させそして

ペレットを2mlの1.2Mソルビトールに再懸濁させた。他の沈降後、プロトプラストを適当なプレート上に広げた。pToC186で形質転換されたA1560菌株からのプロトプラストを、1.0Mスクロース、pH=7.0、窒素源として10mMアセトアミドおよびバックグラウンド増殖を阻止するための20mM CsClを含有する最少プレート(Cove Biochem Biophys. Acta 113(1966)51-56)上に広げた。37℃で4-7日間インキュベーション後、胞子を精製し、滅菌水中で懸濁し次いで第二回の再単離後単一コロニーの胞子を定義した如き形質転換体として保存した。

A. オリゼ菌株内での組換え体コプリナス・シネレウスペルオキシダーゼ変異体の生産

ペルオキシダーゼ遺伝子内に適当な変異を含有するプラスミドを、pCiPおよびpToC186の同量(各々約5μg)の混合物を用い前記の如くA. ニドランス(nidulans)からams遺伝子を含有するpToC186を用い共形質転換によりA. オリゼA1560内に変質転換した。それらの唯一窒素源としてアセトアミドを用いることができた形質転換体を2回再単離した。3回間YPD培地(シャーマン等1981)上で増殖後培養上澄みをペルオキシダーゼ活性分析(PODU)により分析した。

例4

過酸化水素安定性

前記の如く作製した野性型組換え体コプリナス・シネレウス(Coprinus cinereus)ペルオキシダーゼ(rCip)および変異体E239K, Y272F, M276S, M242I+Y272F+E239Kを、H₂O₂の存在下それらの安定性に対し試験した。

試験した変異体のサンプルを次の方法で精製した: 5 lの培養ブロスプロプレクス(Proprex)布を通して吸引濾過することにより澄清化した。3.5 lを、穏やかに攪拌しながら1378 gを硫酸アンモニウム(最終濃度2.5M)に加えた。混合物を5℃で16時間放置した。沈殿物を、5℃で30分間2500 gで遠心分離することにより集めた。沈殿物をCaCl₂溶液(5 mM)に溶解し、最終濃度は200 mlであった。30 mlのこの溶液を12.5 mM トリス pH6.0 緩衝液に対して透析し; 5 lを4時間そして5 lを16時間透析した。

23 mlの透析物をQ-セファロースHPカラム(ファルシア、直径26 mm、100 mm

の床高)に適用した。カラムを12.5mM Bis-トリスpH6.0緩衝液で平衡化した。流速は4ml/分であった。400mlの出発緩衝液をカラムに通過させ、次いで12.5mM Bis-トリスpH6.0緩衝液に溶解した0.25M NaClの線状グーゼントを適用した。総グーゼン量は540mlであった。10mlの分画を集めた。ペルオキシダーゼは0.16M NaClで20ml内に溶出した。0.1Mリン酸ナトリウムpH7で溶出させるセファデックスG25SFのカラム(16mmφ400mm)に、流速4ml/分で4mlを適用した。2mlの分画を集めた。ペルオキシダーゼは6ml内に溶出された。

過酸化水素安定性を試験するための条件：

酵素	25nM
過酸化水素	0.5mM
温度	30℃
pH	10.5
カーボナート緩衝剤	20mM

試験：

炭酸ナトリウム緩衝液22mM pH10.5；1.807gの Na_2CO_3 および0.416gの NaHCO_3 を脱イオン水に溶解し最終容積1lとする。pHをチェックする。

H_2O_2 ：2.2mM

過酸化水素溶液：セファデックスG25SFからのブールを炭酸ナトリウム緩衝液22mMpH10.5で $\text{OD}_{404}=0.0030$ に希釈する。(これは27.5nMに対応する)。

仕上げ：

炭酸ナトリウム緩衝液を30℃に予備加熱する。ペルオキシダーゼ溶液を作成する。ペルオキシダーゼ溶液のサンプルを直ちにとり出しそして希釈しそしてABTS-アッセイに委ねる。5mlのペルオキシダーゼ溶液を、0.5mlの2.2mM H_2O_2 と混合し次いで混合物を30℃の水浴中に置いた。4, 8, 12および16分後、サンプルをとり出し、希釈し次いでABTS-アッセイに委ねる。残留活性は、第一次減衰に適合しておりそして半減期を計算する。rCiPは常に含まれている。

過酸化水素安定性試験の結果を以下の表1に示す。

表 1

变 异 体	$T_{1/2}$ (分)	指 数
rCiP	6.5	1.00
E239K	8.3	1.27
Y272F	8.7	1.34
M276S	7.3	1.13
M242I + Y272F + E239K	14.8	2.27

配列表

(1) 一般情報

(i) 出願人

(A) 氏名：ノボルノディスク A/S, NN

(B) 街：ノボアレ

(C) 市：バグスバエルト

(E) 国：デンマーク

(F) ZIP：DK-2880

(G) 電話：+45 44 44 88 88

(H) テレファックス：+45 44 49 05 55

(I) テレックス：37173

(ii) 発明の名称：ベルオキシダーゼ変異体 2

(iii) 配列の数：1

(iv) コンピュータ読みとり方式

(A) 媒体のタイプ：フロッピーディスク

(B) コンピュータ：IBM PC コンパチブル

(C) 作動システム：PC-DOS / MS-DOS

(D) ソフトウェア：パテントインリリース # 1.0,
バージョン # 1.25 (RPO)

(v) 現出願データ

出願番号：

(2) 配列番号：1 に対する情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ：343 個のアミノ酸

(B) タイプ：アミノ酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類 : cDNA

(vi) 起源 :

(A) 生物名 : コプリナス・シネレウス

(B) 株名 : IP0 8371

(xi) 配列 : 配列番号 1 :

Gln Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser Val Thr Cys Pro Gly Gly Gln Ser
1 5 10 15
Thr Ser Asn Ser Gln Cys Cys Val Trp Phe Asp Val Leu Asp Asp Leu
20 25 30
Gln Thr Asn Phe Tyr Gln Gly Ser Lys Cys Glu Ser Pro Val Arg Lys
35 40 45
Ile Leu Arg Ile Val Phe His Asp Ala Ile Gly Phe Ser Pro Ala Leu
50 55 60
Thr Ala Ala Gly Gln Phe Gly Gly Gly Gly Ala Asp Gly Ser Ile Ile
65 70 75 80
Ala His Ser Asn Ile Glu Leu Ala Phe Pro Ala Asn Gly Gly Leu Thr
85 90 95
Asp Thr Val Glu Ala Leu Arg Ala Val Gly Ile Asn His Gly Val Ser
100 105 110
Phe Gly Asp Leu Ile Gln Phe Ala Thr Ala Val Gly Met Ser Asn Cys
115 120 125
Pro Gly Ser Pro Arg Leu Glu Phe Leu Thr Gly Arg Ser Asn Ser Ser
130 135 140
Gln Pro Ser Pro Pro Ser Leu Ile Pro Gly Pro Gly Asn Thr Val Thr
145 150 155 160
Ala Ile Leu Asp Arg Met Gly Asp Ala Gly Phe Ser Pro Asp Glu Val
165 170 175
Val Asp Leu Leu Ala Ala His Ser Leu Ala Ser Gln Glu Gly Leu Asn
180 185 190
Ser Ala Ile Phe Arg Ser Pro Leu Asp Ser Thr Pro Gln Val Phe Asp
195 200 205
Thr Gln Phe Tyr Ile Glu Thr Leu Leu Lys Gly Thr Thr Gln Pro Gly
210 215 220

Pro Ser Leu Gly Phe Ala Glu Glu Leu Ser Pro Phe Pro Gly Glu Phe
 225 230 235 240
 Arg Met Arg Ser Asp Ala Leu Leu Ala Arg Asp Ser Arg Thr Ala Cys
 245 250 255
 Arg Trp Gln Ser Met Thr Ser Ser Asn Glu Val Met Gly Gln Arg Tyr
 260 265 270
 Arg Ala Ala Met Ala Lys Met Ser Val Leu Gly Phe Asp Arg Asn Ala
 275 280 285
 Leu Thr Asp Cys Ser Asp Val Ile Pro Ser Ala Val Ser Asn Asn Ala
 290 295 300
 Ala Pro Val Ile Pro Gly Gly Leu Thr Val Asp Asp Ile Glu Val Ser
 305 310 315 320
 Cys Pro Ser Glu Pro Phe Pro Glu Ile Ala Thr Ala Ser Gly Pro Leu
 325 330 335
 Pro Ser Leu Ala Pro Ala Pro
 340

【図1】

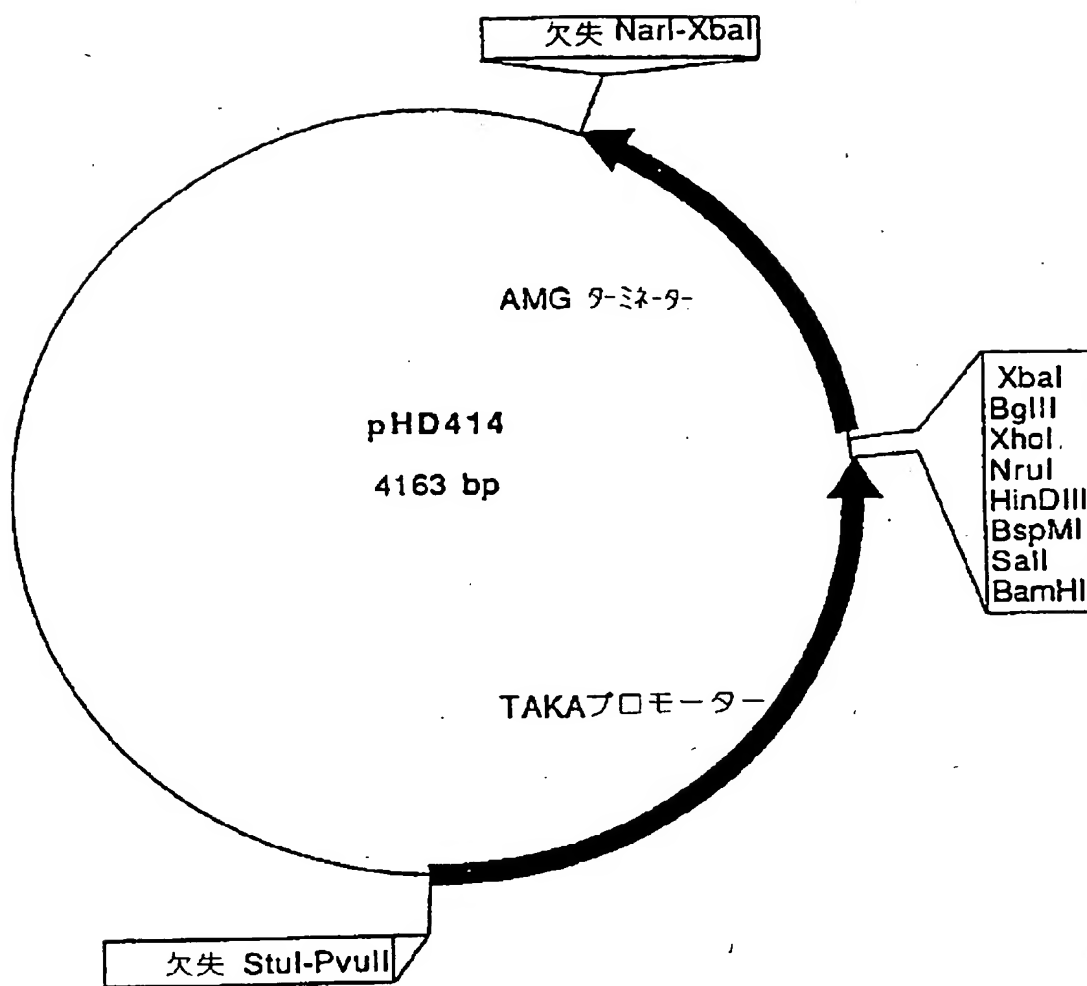


Fig. 1

【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1995年12月12日

【補正内容】

請求の範囲

1. アルカリ条件で改善された過酸化水素安定性を有するペルオキシダーゼ変異体であって、親ペルオキシダーゼ、配列番号1で示されるアミノ酸配列によってコードされるコプリナス・シネレウス(*Coprinus cinereus*)ペルオキシダーゼのアミノ酸残基48~56, 239, 258~262, 264, 266~272の領域における1個又はそれ以上のアミノ酸残基の挿入、欠失又は置換によって特徴づけられている、前記ペルオキシダーゼ変異体。

2. 1又はそれ以上のアミノ酸残基が、次の如く：

K48S,

V53K, A,

E239A, V, L, I, P, F, W, M, G, S, T, C, Y, N, Q, D, K, R, H,

特にE239K, G, S, L, Q, M,

W258F, H,

M261A, V, L, I, P, F, W, G, S, T, C, Y, N, Q, D, E, K, R, H,

特にM261F, V, I, L, Q,

M268A, V, L, I, P, F, W, G, S, T, C, Y, N, Q, D, E, K, R, H,

特にM268F, V, I, L, Q,

Y272A, V, L, I, P, F, W, G, S, T, C, M, N, Q, D, E, K, R, H,

特にY272F

置換されている、請求の範囲第1項記載のペルオキシダーゼ変異体。

3. アルカリ条件下で改善された過酸化水素安定性を有するペルオキシダーゼ変異体であって、親ペルオキシダーゼ、配列番号1で示されるアミノ酸によってコードされるコプリナス・シネレウスペルオキシダーゼのアミノ酸残基の1個又はそれ以上のアミノ酸残基

が、次の如く：

G72Q,
A91C,
N92K,
Q118E,
M125A, P, W, G, S, T, C, Y, N, D, E, K, R, H,
特にM125S, T,
S147Q,
I152C,
P155C,
M166A, P, W, G, S, T, C, Y, N, D, E, K, R, H,
特にM166S, T,
N192K,
I195K,
V206R,
K218R,
F229G,
A230C,
M242A, P, W, G, S, T, C, Y, N, D, E, K, R, H,
特にM242S, T,
S244C,
S252P,
M276A, P, W, G, S, T, C, Y, N, D, E, K, R, H,
特にM276S, T,
K278R,
M279A, P, W, G, S, T, C, Y, N, D, E, K, R, H,
特にM279S, T,

A304E,
V314P,

K41R+K48R,
V53K+Q118E,
V53A+E239G,
I152C+A91C,
P155C+A230C,
M166F+E239K,
G167N+V176L,
E214L+E239L,
R241E+E239K,
S244C+P155C,
E239K+M242I+Y272F,
M166F+E239K+M242I+Y272F,
M125L+M166F+E239K+M242I+Y272F

置換されている、前記ペルオキシダーゼ変異体。

4. 請求の範囲第1～3項のいずれか1項に記載のペルオキシダーゼ変異体の断片である、ペルオキシダーゼ変異体。

5. 請求の範囲第1～4項のいずれか1項に記載のペルオキシダーゼ変異体および過酸化水素又は過酸化水素前駆体、例えばパボラートもしくはパーカーボナート、又は過酸化水素発酵系、例えばオキシダーゼおよびその基質、又はペルオキシカルボン酸又はその塩を含んでなる漂白組成物。

6. ペルオキシダーゼ変異体の量が、1ml当たり0.01～20PODUの洗液中の濃度に相当し、そして過酸化水素又は過酸化水素前駆体又は過酸化水素発酵系又はペルオキシカルボン酸又はその塩の量が、20mMまでの H_2O_2 の洗液中の過酸化水素濃度に相当する、請求の

範囲第5項記載の漂白組成物。

7. 酸化性基質、例えば有機化合物、例えばフェノール性化合物又はフェノチアジン誘導体又はフェノキサジン誘導体を追加的に含んでなる、請求の範囲第5又は6項記載の漂白組成物。

8. 酸化性基質の量が、 $0.1\mu\text{M}$ ～ $100\mu\text{M}$ の洗液中の濃度に相当する、請求の範囲第7項記載の漂白組成物。

9. 界面活性剤、請求の範囲第1～4項のいずれか1項に記載のペルオキシダーゼ変異体および過酸化水素又は過酸化水素前駆体、例えばパボラートもしくはパーカーボナート、又は過酸化水素発生酵素系、例えばオキシダーゼおよびその基質、又はペルオキシカルボン酸又はその塩を含んでなる洗剤組成物。

10. ペルオキシダーゼ変異体の量が、1ml当たり $0.01\sim 20\text{PODU}$ の洗液中の濃度に相当し、そして過酸化水素又は過酸化水素前駆体又は過酸化水素発生酵素系又はペルオキシカルボン酸又はその塩の量が、 20mM までの H_2O_2 の洗液中の過酸化水素濃度に相当する、請求の範囲第9項記載の洗剤組成物。

11. 酸化性基質、例えば有機化合物、例えばフェノール性化合物又はフェノチアジン誘導体又はフェノキサジン誘導体を追加的に含んでなる、請求の範囲第9又は10項記載の洗剤組成物。

12. 酸化性基質の量が、 $0.1\mu\text{M}$ ～ $100\mu\text{M}$ の洗液中の濃度に相当する、請求の範囲第11項記載の洗剤組成物。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DK 94/00382

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC6: C12N 9/08, C11D 3/386

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC6: C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

SE,DK,FI,NO classes as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS, CA, WPI, DERWENT BIOTECHNOLOGY ABSTRACTS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO, A1, 9324618 (NOVO NORDISK A/S), 9 December 1993 (09.12.93), the whole document, see especially page 5 line 27 --	1-12
X	WO, A1, 9105858 (NOVO NORDISK A/S), 2 May 1991 (02.05.91), page 1, line 23 - line 25; page 3, line 1 - line 2; page 3, line 10 - line 26, page 6, line 18 - line 22 --	1-12
X	WO, A1, 9216634 (NOVO NORDISK A/S), 1 October 1992 (01.10.92), page 6, line 24 - page 7, line 11 --	1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search:

16 January 1995

Date of mailing of the international search report

26 -01- 1995

Name and mailing address of the ISA/
Swedish Patent Office
Box 6055, S-102 42 STOCKHOLM
Facsimile No. +46 8 666 02 86

Authorized officer

Hans Bäckström
Telephone No. +46 8 782 25 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DK 94/00382

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP, A1, 0299682 (AMERSHAM INTERNATIONAL PLC), 18 January 1989 (18.01.89), page 2, line 32 - line 36 --	1-4
A	EP, A2, 0179486 (SUNTORY LIMITED), 30 April 1986 (30.04.86) -----	1-12

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DK 94/00382

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1992)

According to rule 13.2, an international application shall relate to one invention only or a group of inventions linked by one or more of the same or corresponding "special technical features", i.e. features that define a contribution which each of the inventions makes over prior art.

Such a link between all the subject of claims 1-12 would be a peroxidase modified to improved stability in the presence of hydrogen peroxide. This *a priori* allegation however is not acceptable due to the state of the art as revealed in the attached search report, e.g. WO 92/16634 (p. 6 line 36 - p. 7 line 11) or WO 91/05858 (p. 3 line 10 - line 26).

Accordingly, the following inventions were found:

Invention 1, claims 1-12 partially: A peroxidase modified at any of amino acid residue 48-56 of the parent peroxidase enzyme (SEQ ID No. 1), a bleaching composition and a detergent composition comprising the peroxidase.

Invention 2, claims 1-12 partially: A peroxidase modified at amino acid residue 76 of the parent peroxidase enzyme (SEQ ID No. 1), a bleaching composition and a detergent composition comprising the peroxidase.

Invention 3, claims 1-12 partially: A peroxidase modified at amino acid residue 109 of the parent peroxidase enzyme (SEQ ID No. 1), a bleaching composition and a detergent composition comprising the peroxidase.

Invention 4, claims 1-12 partially: A peroxidase modified at amino acid residue 214 of the parent peroxidase enzyme (SEQ ID No. 1), a bleaching composition and a detergent composition comprising the peroxidase.

Invention 5, claims 1-12 partially: A peroxidase modified at any of amino acid residue 239 of the parent peroxidase enzyme (SEQ ID No. 1), a bleaching composition and a detergent composition comprising the peroxidase.

Invention 6, claims 1-12 partially: A peroxidase modified at any of amino acid residue 258-272 of the parent peroxidase enzyme (SEQ ID No. 1), a bleaching composition and a detergent composition comprising the peroxidase.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

31/12/94

International application No.
PCT/DK 94/00382

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A1- 9324618	09/12/93	NONE	
WO-A1- 9105858	02/05/91	AT-T- 108484	15/07/94
		AU-B- 646645	03/03/94
		AU-A- 6515790	16/05/91
		AU-A- 6516090	16/05/91
		CA-A- 2067748	14/04/91
		CN-A- 1051600	22/05/91
		DE-D- 69010691	00/00/00
		EP-A,B- 0495836	29/07/92
		SE-T3- 0495836	
		EP-A,B- 0497794	12/08/92
		SE-T3- 0497794	
		ES-T- 2057593	16/10/94
		JP-T- 5500899	25/02/93
		JP-T- 5503542	10/06/93
		US-A- 5273896	28/12/93
		WO-A- 9105839	02/05/91
WO-A1- 9216634	01/10/92	BR-A- 9205802	28/06/94
		EP-A- 0505311	23/09/92
		JP-T- 6506108	14/07/94
EP-A1- 0299682	18/01/89	NONE	
EP-A2- 0179486	30/04/86	SE-T3- 0179486	
		DE-A- 3585133	20/02/92
		JP-C- 1642011	18/02/92
		JP-B- 3001949	11/01/91
		JP-A- 61104784	23/05/86
		US-A- 5116751	26/05/92

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶ 識別記号 序内整理番号 F I

(C 1 2 N 9/08

C 1 2 R 1:69)

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, MW, SD, SZ), AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, FI, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LT, LV, MD, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SI, SK, TJ, T T, UA, US, UZ, VN

(72)発明者 スベンセン, アラン

デンマーク国, デーコー—3460 ビルケレーズ, バックレゼト 28

(72)発明者 チェリー, ジョエル アール,

アメリカ合衆国, カリフォルニア 95616, デービス, アンダーソン ロード 916

(72)発明者 ラムサ, マイケル

アメリカ合衆国, カリフォルニア 95616, デービス, ブルーバード プレイス 641

(72)発明者 シュナイデル, パレ

デンマーク国, デーコー—2750 バレルッブ, リュドトフテン 43

(72)発明者 イェンセン, ビルゲル ロストガールト

デンマーク国, デーコー—3500 ベールレーセ, ストームリュ 32